

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
8. Jg., S. 534–536, September 1970

# Eine fluorometrische Methode zur Bestimmung des Progesterons im Plasma

Von V. GRAEF, E. NOWOTNY<sup>1)</sup> und HJ. STAUDINGER

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger)

(Eingegangen am 22. Juni 1970)

Es wird eine Methode zur Bestimmung des Progesterons im Plasma von Frauen während des Zyklus beschrieben. Das Progesteron wird durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie abgetrennt und durch die Fluoreszenzreaktion auf der Oberfläche von Lithiumhydroxid quantitativ bestimmt. Die Bestimmung läßt sich schnell ausführen. Bei Verwendung von 10 ml Plasma wird eine Empfindlichkeit von 0,1 µg/100 ml erreicht.

## *A fluorometric method for the determination of progesterone in plasma*

A method for the determination of progesterone in the plasma of women during the ovulatory cycle is described. Progesterone is separated by one-dimensional thin-layer chromatography and determined quantitatively by the fluorescence reaction on the surface of lithium hydroxide. The method is rapid. The sensitivity is 0.1 µg/100 ml when 10 ml plasma are used.

Zur Bestimmung des Progesterons im Plasma werden heute vorwiegend gaschromatographische (1, 2, 3) und Doppelisotopenverdünnungsmethoden (4, 5) benutzt. Diese Methoden sind zwar sehr empfindlich und spezifisch, doch benötigen sie kostspielige Geräte, die vorläufig für routinemäßige Untersuchungen nur selten zur Verfügung stehen. Deshalb haben wir eine früher in unserem Institut entwickelte Methode (6) zur fluorometrischen Bestimmung von  $\Delta^4$ -3-Oxosteroiden zur quantitativen Bestimmung des Progesterons im Plasma herangezogen. Diese Methode beruht darauf, daß  $\Delta^4$ -3-Oxosteroide auf der Oberfläche eines Lithiumhydroxid-Preßlings eine spezifische Fluoreszenz erzeugen. Dieses Prinzip wurde bereits zur Bestimmung des Aldosterons im Harn (7) und des Testosterons im Harn (8) und im Plasma (9) angewandt. Die Empfindlichkeit der Methode reicht aus, um die Schwankungen des Progesterongehaltes des Plasmas während des normalen Zyklus erfassen zu können.

## Methodik

### Reagenzien

**Diäthyläther:** DAB 6 (Firma Riedel de Haen) wird über Natriumdraht destilliert. Er wird in einer braunen Flasche aufbewahrt und soll nicht älter als 3 Tage sein.

**Methylenchlorid:** 2 l Methylenchlorid werden mit 200 ml 0,1proz. Kaliumpermanganat-Lösung, mit 200 ml 1N NaOH und dreimal mit je 400 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach 24stdg. Trocknen über wasserfreiem Calciumchlorid wird das Lösungsmittel destilliert.

**Chloroform:** p. a. (Firma E. Merck, Darmstadt)

**Benzol:** p. a. (Firma E. Merck, Darmstadt)

**Äthylacetat:** p. a. (Firma E. Merck, Darmstadt)

**n-Hexan:** rein (Firma E. Merck, Darmstadt)

**Methanol:** p. a. (Firma E. Merck, Darmstadt) wird über Natriumborhydrid (2 g/l) destilliert und dann an einer Füllkörperkolonne redestilliert.

**Aluminiumoxid:** GF<sub>254</sub> für Dünnschichtchromatographie (Firma E. Merck, Darmstadt)

**Dünnschichtplatten:** Glasplatten (20 × 20 cm) werden mit einer 0,25 mm dicken Schicht Aluminiumoxid GF<sub>254</sub> versehen, 3 Stdn. im Trockenschrank bei 110° erhitzt und in einem Exsikkator ohne Trockenmittel aufbewahrt.

**Lithiumhydroxid:** etwa 98% (Firma E. Merck, Darmstadt)

**Progesteron:** (Firma E. Merck, Darmstadt).

Die verwendeten Glasgeräte werden mit Chromschwefelsäure gereinigt und sehr gründlich mit Leitungswasser und dest. Wasser gespült.

### Extraktion des Plasmas

Blut wird unter Zusatz von Heparin (0,2 ml = 200 E/20 ml Blut) abgenommen und sofort zentrifugiert. 10 ml Plasma werden mit 3 ml 1N NaOH versetzt und einmal mit 50 ml und einmal mit 30 ml absol. Äther extrahiert. Man wäscht die vereinigten Ätherextrakte zweimal mit je 10 ml dest. Wasser, trocknet sie über wasserfreiem Natriumsulfat und verdampft den Äther am Rotationsverdampfer. Den Rückstand versetzt man mit 7 ml Methanol und 3 ml Wasser, überführt die Lösung nach Abkühlen in einen Schütteltrichter und spült mit 5 ml 70proz. Methanol nach. Die wäßrig-methanolische Lösung wird mit 5 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren entfernt man die obere Phase und dampft die wäßrig-methanolische Lösung am Rotationsverdampfer bei 40° ein. Reste von Wasser werden durch Abdampfen mit Äthanol entfernt. Der Verdampfungsrückstand wird mit dreimal je 2 ml Chloroform in ein spitzen Zentrifugenröhrchen überführt, die Lösung dampft man am Rotationsverdampfer ein.

### Dünnschichtchromatographie

Man trägt den Verdampfungsrückstand des Plasmaextraktes mit dreimal 100 µl Chloroform auf eine Dünnschichtplatte (Aluminiumoxid GF<sub>254</sub>) 2 cm vom unteren Rand entfernt auf. Links und rechts neben dem Plasmaextrakt werden als Bezugssubstanz je 3 µg Progesteron in 10 µl Chloroform aufgetragen. Man entwickelt die Platte im System Benzol/Methylenchlorid/Äthylacetat (3:1:1 V/V) und markiert die Progesteron enthaltende Zone des Plasmaextraktes anhand der beiden unter der UV-Lampe erkennbaren Progesteron-Flecken. Die Zone mit dem Progesteron des Plasmaextraktes wird ausgekratzt, das Aluminiumoxid wird in 2 ml Methanol aufgenommen und unter Zusatz einer Glasperle 5 Min. in einer Schüttelmaschine geschüttelt. Dann zentrifugiert man bei 3000 U./Min. und pipettiert das Eluat in ein spitzen Zentrifugenröhrchen, in dem es einge-

<sup>1)</sup> Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung.

dampft wird. Das Aluminiumoxid wird nochmal in der gleichen Weise mit 2 ml und dann mit 1 ml Methanol eluiert. Die Eluate werden im gleichen Spitzröhrchen eingedampft. Zur Gewinnung eines „Plattenleerwertes“ kratzt man eine Fläche, die dem Plasma-Progesteron-Fleck in der Größe entspricht, in Höhe des Progesterons von einer Stelle der Platte, wo kein Steroid gelaufen war. Das Adsorbens wird in der gleichen Weise eluiert.

#### Quantitative Bestimmung

Die Lithiumhydroxid-Preßlinge werden in der schon beschriebenen Weise (6) hergestellt. Man löst den Verdampfungsrückstand der Eluate vom Hauptwert (Plasma-Progesteron) und vom Plattenleerwert in 100  $\mu$ l Chloroform und engt die Lösung durch Einblasen von Stickstoff auf etwa 10  $\mu$ l ein. Diese Lösung trägt man auf den Lithiumhydroxid-Preßling auf. Das Spitzröhrchen wird noch zweimal mit je 100  $\mu$ l Chloroform ausgespült. Diese Lösungen werden nach Einengen auf 10  $\mu$ l auf den gleichen Preßling aufgetragen. Zur Bestimmung eines Standard-Wertes engt man eine Lösung von 0,1  $\mu$ g Progesteron/100  $\mu$ l Chloroform in einem Spitzröhrchen mit Stickstoff auf 10  $\mu$ l ein und trägt diese Lösung auf einen Lithiumhydroxid-Preßling auf. Das Röhrchen wird in der gleichen Weise wie beim Hauptwert ausgespült. Zur Bestimmung eines Reagenzien-Leerwertes engt man 100  $\mu$ l Chloroform im Spitzröhrchen auf 10  $\mu$ l ein, trägt diese auf einen Preßling auf und spült dieses Röhrchen ebenfalls noch zweimal mit je 100  $\mu$ l Chloroform aus. Die Fluoreszenz der Preßlinge wird vor und nach 20 Min. Erhitzen auf 100° (Trockenschrank) in einem Photometer „Eppendorf“ mit Fluoreszenzzusatz gemessen. Die während des Erhitzens auftretende Fluoreszenz ist der Progesteronmenge proportional. Die Fluoreszenz des Hauptwertes wird in folgender Weise errechnet:

$$F_H = F_H(\text{nach}) - F_H(\text{vor}) \quad H = \text{Hauptwert}$$

$$F_{PL} = F_{PL}(\text{nach}) - F_{PL}(\text{vor}) \quad PL = \text{Plattenleerwert}$$

$$F_{PP} = F_H - F_{PL} \quad F = \text{relative Intensität der Fluoreszenz}$$

(vor) = vor dem Erhitzen  
(nach) = nach dem Erhitzen  
PP = Plasma-Progesteron

Die Fluoreszenz für den Progesteron-Standard errechnet man in folgender Weise:

$$F_S = F_S(\text{nach}) - F_S(\text{vor}) \quad RL = \text{Reagenzien-Leerwert}$$

$$F_{RL} = F_{RL}(\text{nach}) - F_{RL}(\text{vor}) \quad S = \text{Standard}$$

$$F_{\text{Stand.-P}} = F_S - F_{RL}$$

In der untersuchten Probe sind  $\frac{0,1 \cdot F_{PP}}{F_{\text{Stand.-P}}} \mu\text{g}$  Progesteron enthalten.

#### Ergebnisse

##### Spezifität der Methode

Wie in früheren Untersuchungen (10) festgestellt wurde, ist die Fluoreszenzreaktion auf Lithiumhydroxid-Preßlingen spezifisch für  $\Delta^4$ -3-Oxosteroiden. Wie aus den Angaben in Tabelle 1 ersichtlich ist, ist Progesteron

Tab. 1

$R_F$ -Werte verschiedener  $\Delta^4$ -3-Oxosteroiden, Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxid GF<sub>254</sub>, System Benzol/Methylenchlorid/Äthylacetat (3:1:1 V/V)

Steroid	$R_F$
Cortisol	0
Corticosteron	0
11 $\beta$ -Hydroxy-progesteron	0,15
20 $\alpha$ -Hydroxy-progesteron	0,23
Adrenosteron	0,28
20 $\beta$ -Hydroxy-progesteron	0,29
11-Oxo-progesteron	0,38
Androstendion-(3,17)	0,56
Progesteron	0,67

bei der Dünnschichtchromatographie von anderen  $\Delta^4$ -3-Oxosteroiden getrennt. Wir untersuchten ferner Sammelpasma von Männern nach der angegebenen Methode. Der Progesterongehalt dieses Plasmas lag unter der Nachweisgrenze der Methode (0,1  $\mu$ g/100 ml).

#### Richtigkeit der Methode

Zur Prüfung der Richtigkeit der Methode wurden je 10 ml Sammelpasma von Männern 0,025 und 0,05  $\mu$ g Progesteron zugesetzt, von denen 96 bzw. 90% wiedergefunden wurden (Tab. 2).

Tab. 2

Ergebnisse von Wiederfindungsversuchen, bei denen jeweils 10 ml Männerplasma verschiedene Mengen Progesteron zugesetzt wurden

Progesteron	
zugesetzt $\mu$ g	wiedergefunden $\mu$ g
0,025	0,026
0,025	0,024
0,025	0,021
0,025	0,024
0,025	0,027
	$\bar{x} = 0,024$ (96 %)
0,05	0,048
0,05	0,038
0,05	0,048
0,05	0,049
0,05	0,048
0,05	0,045
	$\bar{x} = 0,045$ (90 %)

#### Genauigkeit der Methode

Der Progesterongehalt eines Mischplasmas wurde zehnmal bestimmt. Dabei wurde als Mittel eine Konzentration von 0,76  $\mu$ g/100 ml gefunden. Die Standard-Abweichung betrug  $s = 0,037 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .

Tab. 3

Genauigkeit der Methode. Mehrfachbestimmung von Mischplasma

Progesteron $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$
0,73
0,79
0,71
0,76
0,81
0,71
0,77
0,79
0,81
0,76
$\bar{x} = 0,76$

Standard-Abweichung  $s = 0,037$   
Variationskoeffizient  $V = 4,9\%$

#### Empfindlichkeit

Mit der angegebenen Methode ist es möglich, Progesteron-Konzentrationen bis 0,1  $\mu$ g/100 ml Plasma zu bestimmen.

#### Normalwerte

Wir bestimmten den Progesteron-Gehalt des Plasmas von 7 Frauen während der lutealen Phase und fanden

eine durchschnittliche Progesteron-Konzentration von  $1,38 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ . In der präovulatorischen Phase wurden  $0,20$  bzw.  $< 0,10 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  bestimmt (Tab. 4).

Tab. 4  
Progesteron im Plasma von Frauen während des normalen Zyklus

Zyklustag	Progesteron ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )
Luteale Phase	
20	1,00
20	1,02
19	1,23
20	1,61
18	1,95
16	1,05
12*)	1,84
	$\bar{x} = 1,38$
Präovulatorische Phase	
5	0,20
5	$< 0,10$

\*) Zyklus von 21 Tagen

### Diskussion

Die hier beschriebene Methode eignet sich zur schnellen und empfindlichen Bestimmung des Progesterons im Plasma von Frauen. Sie läßt sich mit einfachen Mitteln ohne Verwendung von isotonenmarkierten Verbindungen oder eines Gaschromatographen ausführen. Die

Lipide werden in üblicher Weise durch Verteilung zwischen 70proz. Methanol und *n*-Hexan entfernt. In der folgenden eindimensionalen Dünnschichtchromatographie wird Progesteron von anderen  $\Delta^4$ -3-Oxosteroiden getrennt, denn nur diese geben die Fluoreszenzreaktion auf der Oberfläche von Lithiumhydroxid-Preßlingen. Aufgrund der wenigen Reinigungsschritte beträgt die Wiederfindung 90–96%. Wegen des geringen Aufwandes kann diese Methode zur routinemäßigen Bestimmung des Progesterons im Plasma von Frauen verwendet werden. In Männerplasma wurde erwartungsgemäß eine Progesteron-Konzentration von weniger als  $0,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  gefunden. Nach den Angaben in der Literatur (1, 4, 5) wurden im Plasma von Männern durchschnittlich  $0,03 \mu\text{g}$  Progesteron/100 ml gefunden. Die von uns im Plasma von Frauen während des Zyklus gefundenen Progesteronmengen stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren überein. Die Mittelwerte der Progesteron-Konzentration im Plasma in der lutealen Phase liegen bei anderen Untersuchern zwischen  $1,04$  und  $1,52 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ , während wir als Mittelwert  $1,38 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  gefunden haben. Die Empfindlichkeit von  $0,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  reicht aus, um Schwankungen des Progesteron-Gehaltes des Plasmas während des Zyklus erfassen zu können.

### Literatur

1. VAN DER MOLEN, H. J. und D. GROEN, J. Clin. Endocr. Springfield 25, 1625 (1965). — 2. WYMAN, H. und I. F. SOMMERVILLE, Steroids 12, 63 (1968). — 3. ZANDER, J. und B. RUNNEBAUM in R. I. DORFMAN (Ed.) Methods in Hormone Research, Vol I, S. 212, Academic Press, New York-London (1968). — 4. RIONDEL, A., J. F. TAIT, S. A. S. TAIT, M. GUT und B. LITTLE, J. Clin. Endocr., Springfield 25, 229 (1965). — 5. YOSHIMI, T. und M. B. LIPSETT, Steroids 11, 527 (1968). — 6. NOWOTNY, E., R. ABRAHAM und HJ. STAUDINGER, diese Z. 3, 8 (1965). — 7. NOWOTNY, E. und HJ. STAUDINGER, diese Z. 4, 203 (1966). — 8. GRAEF, V., P. JOBST und HJ. STAUDINGER, diese Z. 6, 159 (1968). — 9. GRAEF, V. und HJ. STAUDINGER, diese Z. 6, 280 (1968). — 10. ABRAHAM, R. und HJ. STAUDINGER, Z. Naturforsch. 18b, 421 (1963).

Prof. Dr. HJ. Staudinger  
6300 Gießen  
Friedrichstr. 24